

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer:

0 127 797

A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 84105272.3

(51) Int. Cl.³: C 07 D 487/22

C 09 B 47/00, G 01 N 33/54

(22) Anmeldetag: 10.05.84

(30) Priorität: 03.06.83 CH 3045/83

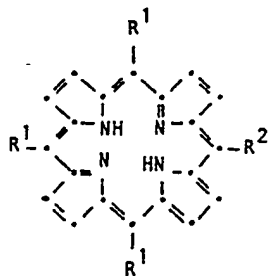
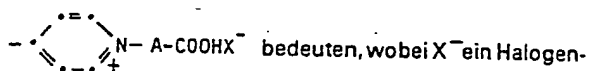
(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
12.12.84 Patentblatt 84/50(84) Benannte Vertragsstaaten:
BE CH DE FR GB IT LI NL(71) Anmelder: F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO.
Aktiengesellschaft

CH-4002 Basel(CH)

(72) Erfinder: Schmidt, Dieter, Dr.
Redingstrasse 20
CH-4052 Basel(CH)(72) Erfinder: Steffen, Hans, Dr.
Olsbergerstrasse 27
CH-4411 Arisdorf(CH)(74) Vertreter: Kloter, Rudolf et al,
Postfach 3255 Grenzacherstrasse 124
CH-4002 Basel(CH)

(54) Markermoleküle für Fluoreszenz-Immuno-Assays sowie Verfahren und Zwischenprodukte zu deren Herstellung.

(57) Es werden neue Porphyrinderivate der allgemeinen Formel

R² die Gruppe

bedeuten, wobei X⁻ ein Halogenion, ein Arylsulfonion, ein Alkylsulfonion oder ein Alkylsulfation, A (C₁₋₈)-Alkylen und R³ (C₁₋₄)-Alkyl bedeuten, und Sulfonsäuresalze von Verbindungen der Formel I, worin



worin entweder R¹ die Gruppe und R² die

Gruppe -COOH; -A -COOH oder

-O-A-COOH, oder R¹ die Gruppe

-N-R³X⁻ und

sowie Verfahren und Zwischenprodukte zu deren Herstellung beschrieben.

Die neuen Porphyrinderivate eignen sich wegen ihrer Wasserlöslichkeit als Markermoleküle für hochempfindliche Fluoreszenz-Immuno-Assays, insbesondere für den zeitaufgelösten Fluoreszenz-Immuno-Assay. Die Kopplung der neuen Porphyrinderivate an immunologisch aktive Materialien erfolgt in herkömmlicher Weise, z.B. mit einem wasserlöslichen Carbodiimid-Derivat.

EP 0 127 797 A1

- 1 -

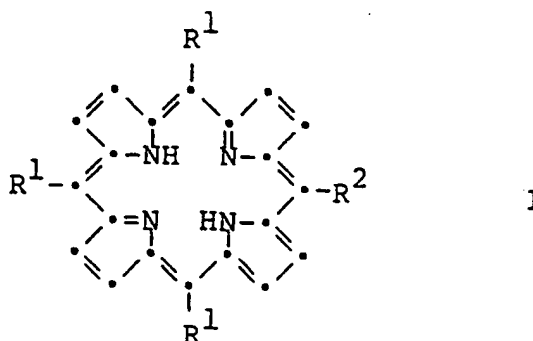
RAN 4090/149

5 Markermoleküle für Fluoreszenz-Immuno-Assays
sowie Verfahren und Zwischenprodukte zu deren
Herstellung

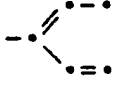
10


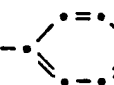
15 Die vorliegende Erfindung betrifft Porphyrinderivate
der allgemeinen Formel

20

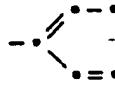
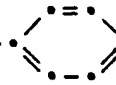


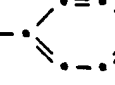
25

worin entweder R¹ die Gruppe  und R²

die Gruppe ,  oder

30

, oder R¹ die Gruppe 

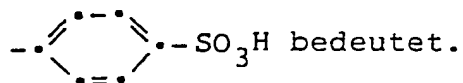
und R² die Gruppe  bedeuten, wobei

35

X⁻ ein Halogenion, ein Arylsulfonation, ein Alkyl-
sulfonation oder ein Alkylsulfation, A (C₁-₈)-Alkylen
und R³ (C₁-₄)-Alkyl bedeuten,

und Sulfonsäuresalze von Verbindungen der Formel I, worin

R¹ die Gruppe



- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren und Zwischenprodukte für die Herstellung dieser Verbindungen.

Die Ausdrücke "Alkyl" und "Alkylen" bezeichnen gerad-
 10 kettige oder verzweigte, gesättigte Kohlenwasserstoffreste. Der Ausdruck "(C₁₋₄)-Alkyl" bezeichnet Reste mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen, wie Methyl und dergleichen. Der Ausdruck "(C₁₋₈)-Alkylen" bezeichnet Reste mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen, wie Methylen, Pentamethylen und dergleichen. Der
 15 Ausdruck "Halogen" für sich allein genommen oder in Kombinationen, wie "Halogenion", bezeichnet die Halogene Chlor, Brom und Jod.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung bevorzugte Verbindungen der Formel I sind:

4-[10,15,20-Tris(4-sulfophenyl)-21H,23H-porphin-5-yl]benzoesäure,

[4-[10,15,20-Tris(4-sulfophenyl)-21H,23H-porphin-5-yl]phenoxy]essigsäure,

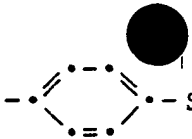
6-[4-[10,15,20-Tris(4-sulfophenyl)-21H,23H-porphin-5-yl]phenyl]hexancarbonsäure,

1-(Carboxymethyl)-1',1'',1'''-trimethyl-4,4',4'',4'''-(21H,23H-porphin-5,10,15,20-tetrayl)tetrakispyridinium
 30 tetrajodid,

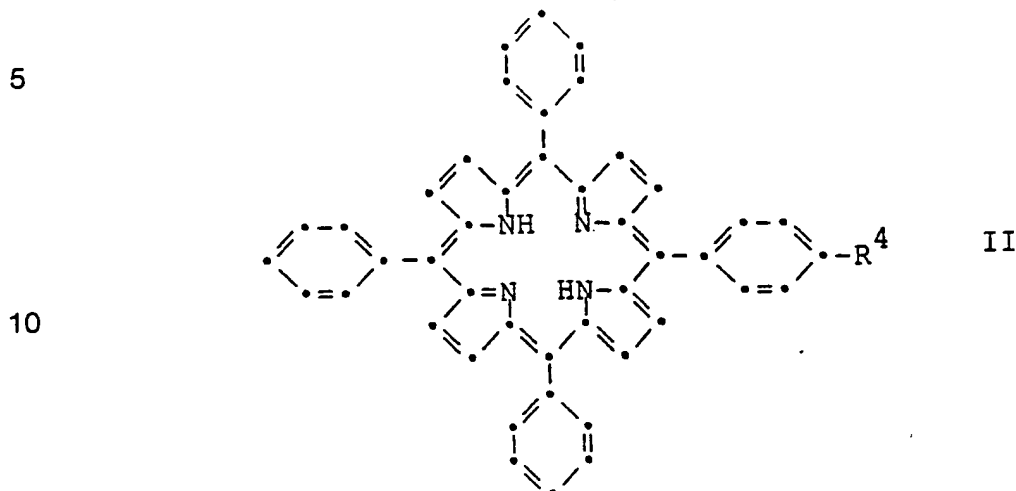
1-(2-Carboxyäthyl)-1',1'',1'''-trimethyl-4,4',4'',4'''-(21H,23H-porphin-5,10,15,20-tetrayl)tetrakispyridinium bromid
 trijodid und

1-(5-Carboxypentyl)-1',1'',1'''-trimethyl-4,4',4'',4'''-(21H,23H-porphin-5,10,15,20-tetrayl)tetrakispyridinium
 35 bromid trijodid.

Die Verbindungen der Formel I und, wenn R¹ die Gruppe

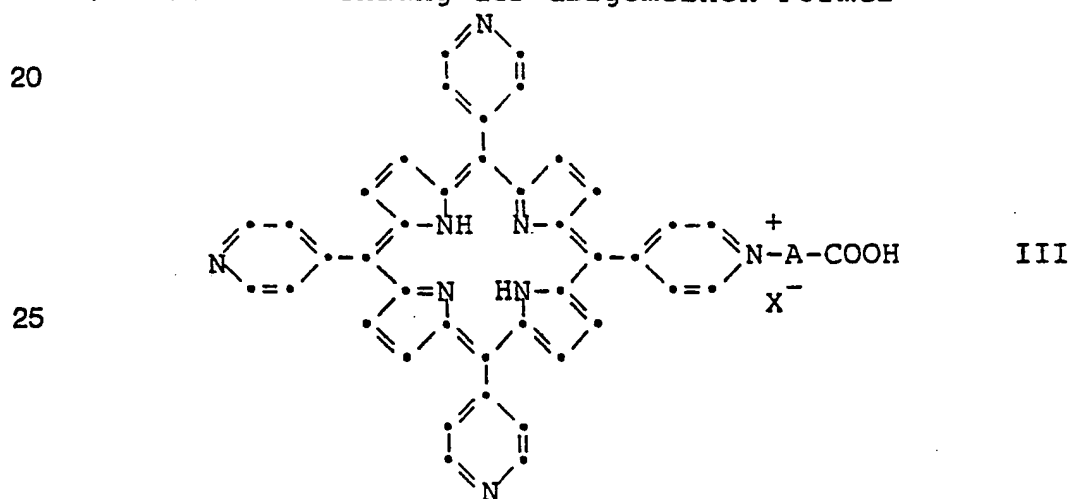

 $\text{--SO}_3\text{H}$ bedeutet, die entsprechenden Sulfonsäuresalze können erfindungsgemäss hergestellt werden, indem man

a) eine Verbindung der allgemeinen Formel



worin R^4 die Gruppe --COOH , --A--COOH oder --O--A--COOH
 und A (C_{1-8})-Alkylen bedeuten,
 mit einem die Gruppe $\text{--SO}_3\text{H}$ liefernden Mittel umgesetzt, oder

b) eine Verbindung der allgemeinen Formel



worin A (C_{1-8})-Alkylen und X^- ein Halogenion, ein
 Arylsulfonation, ein Alkylsulfonation oder ein Alkyl-
 sulfation bedeuten,
 mit einem einen (C_{1-4})-Alkylrest liefernden Mittel be-
 handelt und erwünschtenfalls

35 c) eine nach Verfahren a) erhaltene Verbindung in ein
 Sulfonsäuresalz überführt.

Gemäss Verfahrensvariante a) können Verbindungen der

Formel I, worin R^1 die Gruppe $-\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H}$ und R^2 die Gruppe $-\text{C}_6\text{H}_4\text{COOH}$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{A-COOH}$ oder $-\text{C}_6\text{H}_4\text{O-A-COOH}$ bedeuten,

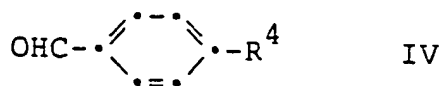
- 5 durch Sulfonierung der Phenylgruppen in einer Verbindung der Formel II hergestellt werden. Als Sulfonierungsmittel verwendet man vorzugsweise konzentrierte Schwefelsäure, wobei man bei erhöhter Temperatur, z.B. bei etwa 100°C , arbeitet. Die gewünschte Sulfonierung kann jedoch auch nach
10 anderen an sich bekannten Methoden durchgeführt werden.

Gemäss Verfahrensvariante b) können Verbindungen der

- Formel I, worin R^1 die Gruppe $-\text{C}_5\text{H}_4\text{N}^+\text{R}^3\text{X}^-$ und R^2 die Gruppe
15 $-\text{C}_5\text{H}_4\text{N}^+\text{A-COOHX}^-$ bedeuten, durch Alkylierung der Pyridinstickstoffatome in einer Verbindung der Formel III hergestellt werden. Als Alkylierungsmittel können entsprechende Alkylhalogenide, wie Methyljodid, Arylsulfonsäure-Alkylester,
20 wie Aethyl p-Toluolsulfonat, Alkylsulfonsäure-Alkylester, Dialkylsulfate, wie Diäthylsulfat, und dergleichen verwendet werden. Geeignete Lösungsmittel sind in erster Linie polare Lösungsmittel, beispielsweise Alkohole, wie Methanol, und Mischungen davon mit Wasser. Die Reaktion wird vor-
25 zugsweise bei Raumtemperatur durchgeführt.

- Die Herstellung der Sulfonsäuresalze gemäss Verfahrensvariante c) erfolgt nach an sich bekannten und jedem Fachmann geläufigen Methoden. Es kommen dabei sowohl Salze mit
30 anorganischen Basen, z.B. Alkalimetallsalze, als auch Salze mit organischen Basen, z.B. Ammoniumsalze, in Frage. Bevorzugt werden die entsprechenden Natriumsalze.

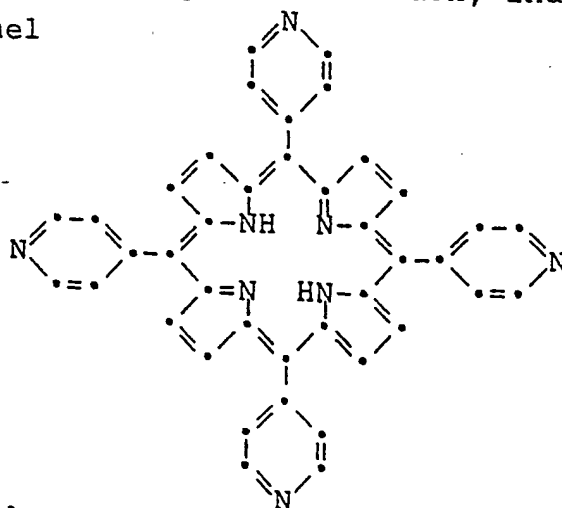
- Die als Ausgangsstoffe verwendeten Verbindungen der
35 Formel II sind neu und ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Sie können hergestellt werden, indem man Pyrrol, Benzaldehyd und einen Aldehyd der allgemeinen Formel



5 worin R^4 die obige Bedeutung besitzt,
 im Molverhältnis 4:3:1 miteinander kondensiert. Diese
 Kondensation erfolgt nach an sich bekannten und jedem Fach-
 mann geläufigen Methoden. In einer bevorzugten Ausführungs-
 form wird das Pyrrol in einem sauren organischen Lösungs-
 10 mittel, wie Essigsäure und Propionsäure, vorgelegt, und ein
 Gemisch der beiden Aldehyde (vorzugsweise im Molverhältnis
 3:1) langsam zugegeben. Die Reaktionstemperatur ist zwar
 nicht kritisch, man arbeitet jedoch vorzugsweise bei er-
 höhter Temperatur, beispielsweise bei der Siedetemperatur
 15 der Reaktionsmischung. Die Auftrennung des Produktgemisches
 erfolgt zweckmässigerweise in an sich bekannter Weise
 mittels chromatographischer Methoden.

Die Verbindungen der Formel IV sind bekannt oder können
 20 nach an sich bekannten Methoden und in Analogie zur Her-
 stellung bekannter Vertreter dieser Stoffklasse hergestellt
 werden.

Die als Ausgangsstoffe verwendeten Verbindungen der
 25 Formel III sind neu und ebenfalls Gegenstand der vorliegenden
 Erfindung. Sie können hergestellt werden, indem man die Ver-
 bindung der Formel



V

35 mit einer Verbindung der allgemeinen Formel

X-A-COOH

VI

worin X und A obige Bedeutung besitzen,
umsetzt. Als Lösungsmittel eignen sich beispielsweise
5 halogenierte Kohlenwasserstoffe, wie Methylenchlorid und
Chloroform, Alkohole, wie Methanol und Aethanol, Mischungen
der erwähnten Lösungsmittel und dergleichen. Je nach Reak-
tivität der eingesetzten Verbindung der Formel VI kann
die Reaktion in einem Temperaturbereich von etwa Raum-
10 temperatur bis zur Siedetemperatur der Reaktionsmischung
durchgeführt werden.

Die Verbindung der Formel V kann durch Kondensation von
Pyrrol und Pyridin-4-carbaldehyd (Molverhältnis 1:1) nach
15 hinlänglich bekannten Methoden hergestellt werden. Es
können beispielsweise die gleichen Reaktionsbedingungen
wie bei der früher beschriebenen Herstellung von Verbin-
dungen der Formel II angewendet werden.

20 Die Porphyrine gemäss allgemeiner Formel I bzw. deren
Sulfonsäuresalze lassen sich fluoreszenzspektroskopisch
sehr empfindlich nachweisen. Da sie wasserlöslich sind, sind
sie bestens geeignet als Markermoleküle für hochempfindliche
Fluoreszenz-Immuno-Assays. Sie sind insbesondere geeignet
25 für einen zeitaufgelösten Fluoreszenz-Immuno-Assay, wie er
beispielsweise in der DT-OS 26 28 158 beschrieben wird.
Durch die Verwendung der Porphyrine gemäss allgemeiner
Formel I anstelle des häufig verwendeten FITC (Fluorescein-
isocyanat) kann die Nachweisempfindlichkeit bei Fluoreszenz-
30 Immuno-Assays verbessert werden. Dies ist insbesondere bei
der Bestimmung geringer Mengen von Antigenen in Körper-
flüssigkeiten, wie z.B. Plasma und Serum, von Vorteil. Ein
Beispiel eines solchen Antigens ist das carcinoembryonale
Antigen (CEA). Die Kopplung einer Verbindung der allge-
35 meinen Formel I an ein immunologisches Material erfolgt in
herkömmlicher Weise, z.B. mit einem wasserlöslichen Carbo-
diimid-Derivat, z.B. mit 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholino-
äthyl)-carbodiimid-p-toluolsulfonat.

Beispiel 1

- a) Man erhitzt eine Mischung aus 2,5 ml Pyrrol und 134 ml Propionsäure zum Sieden und versetzt dann tropfenweise mit
5 einer Lösung von 2 g p-Formylphenylcapronsäure und 3 ml Benzaldehyd in 5 ml Propionsäure. Man erhitzt noch während 30 Minuten unter Rückfluss zum Sieden, lässt die Reaktionslösung auf Zimmertemperatur abkühlen und neutralisiert die Propionsäure mit insgesamt 9,5 g Natriumhydroxid (pH 4).
10 Man lässt über Nacht stehen und filtriert dann den schwarzen Niederschlag ab. Die Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an 1,2 kg Kieselgel, wobei man nacheinander mit den folgenden Lösungsmitteln eluiert: Chloroform/Cyclohexan (1:1), Chloroform/Essigester (3:2) und (2:3), Essigester und
15 Essigester mit 2% Methanol. Das so erhaltene Produkt wird noch zweimal wie oben beschrieben chromatographiert und dann umkristallisiert. Hierzu wird das Produkt im möglichst wenig Chloroform gelöst, worauf man die doppelte Menge an Methanol zugibt und über Nacht bei 4°C stehen lässt. Nach dem Ab-
20 filtrieren werden die Kristalle mit Methanol gewaschen und dann im Vakuum bei 20°C getrocknet. Man erhält 810 mg (12%) 6-[4-(10,15,20-Triphenyl-21H,23H-porphin-5-yl)phenyl]hexan-carbonsäure.
- b) Man suspendiert 400 mg fein pulverisierte 6-[4-(10,15,20-Triphenyl-21H,23H-porphin-5-yl)phenyl]hexan-carbonsäure in 10 ml konzentrierter Schwefelsäure, erhitzt dieses Gemisch unter Feuchtigkeits- und Lichtausschluss während 6 Stunden auf 100°C und lässt dann über Nacht bei 20°C
30 stehen. Anschliessend gibt man vorsichtig 15 ml Wasser hinzu, wobei sich das Gemisch erwärmt, und lässt wieder auf Zimmertemperatur abkühlen. Das ausgefallene grüne protonierte Produkt wird abfiltriert, mit wenig Aceton gewaschen, zusammen mit etwas Celite in 15 ml Wasser suspendiert und
35 mit gesättigter Natriumbicarbonatlösung neutralisiert, bis sich die Lösung von grün nach rot-violett verfärbt. Reste von nicht umgesetztem Ausgangsprodukt werden zusammen mit dem Celite abfiltriert. Das Filtrat (etwa 100 ml) wird

4mal je 3 Stunden lang gegen 4 Liter Wasser dialysiert (um anorganische Salze zu entfernen) und dann lyophilisiert. Die Reinigung erfolgt durch Chromatographie an Acrylamid-Gel AcA54 (LKB); Elutionsmittel: 150 mM Kochsalzlösung, das 10 mMol/l Natriumphosphat enthält (pH 7). Die Fraktionen mit reinem Produkt werden gepoolt und zur Entfernung des Kochsalzes gegen Wasser dialysiert und dann lyophilisiert. Man erhält 189 mg (35%) 6-[4-[10,15,20-Tris(4-sulfophenyl)-21H,23H-porphin-5-yl]phenyl]hexan-carbonsäure-tetranatriumsalz.

UV: λ (ϵ), 414 (364 000), 516 (12700), 553 (6100), 578 (5600), 634 (3400) nm.

15

Beispiel 2

a) In Analogie zu den Angaben in Beispiel 1 a) erhält man aus Pyrrol, Benzaldehyd und p-Formyl-phenoxyessigsäure in einer Ausbeute von 7% [4-(10,15,20-Triphenyl-21H,23H-porphin-5-yl)phenoxy]essigsäure.

Die als Ausgangsstoff verwendete p-Formyl-phenoxy-essigsäure wird aus p-Hydroxybenzaldehyd und Jodessigsäure in an sich bekannter Weise hergestellt.

25

b) In Analogie zu den Angaben in Beispiel 1 b) erhält man aus [4-(10,15,20-Triphenyl-21H,23H-porphin-5-yl)-phenoxy]essigsäure in einer Ausbeute von 15% [4-[10,15,20-Tris(4-sulfophenyl)-21H,23H-porphin-5-yl]phenoxy]essigsäure.

30

UV: λ (ϵ), 414 (397000), 517 (13000), 554 (6400), 579 (5600), 635 (3100) nm.

35

Beispiel 3

a) Man erhitzt 187 ml Propionsäure unter Rühren am Rückfluss und versetzt dann zuerst mit 3,47 ml Pyrrol und dann
5 tropfenweise (innert 15 Minuten) mit 4,81 ml Pyridin-4-carbaldehyd. Man erhitzt während 30 Minuten am Rückfluss, lässt die Reaktionslösung auf Zimmertemperatur abkühlen, versetzt mit 105 g Natriumhydroxid in 400 ml Wasser, wobei mit Eis gekühlt wird, und nutscht den erhaltenen schwarzen
10 Niederschlag ab. Zur Reinigung löst man diesen in 400 ml Chloroform und fällen das Produkt dann durch langsame Zugabe von 700 ml Cyclohexan aus. Durch dreimaliges Aufschlännen in wenig Chloroform und anschliessendem Abnutschen werden noch weitere Verunreinigungen entfernt. Die weitere Reinigung
15 erfolgt durch zweimalige Säulenchromatographie an Kieselgel; Elutionsmittel: Chloroform, Chloroform/Methanol (9:1), Chloroform/Methanol (8:2) und Chloroform/Methanol (7:3). Das erhaltene Material wird in Aceton aufgeschlämmt, abge-
nutscht und an Kieselgel unter Eluieren mit Chloroform,
20 das 3% Methanol enthält, chromatographiert. Man erhält 600 mg (8%) 5,10,15,20-Tetra(4-pyridyl)-21H,23H-porphin.

b) Man löst 180 mg 5,10,15,20-Tetra(4-pyridyl)-21H,23H-porphin in 70 ml Chloroform/Methanol (9:1), versetzt mit
25 585 mg 6-Brom-Caprinsäure und erhitzt anschliessend während 20 Stunden am Rückfluss. Dann engt man die Lösung im Vakuum auf 5 bis 10 ml ein und fällen das Produkt durch Zugabe von 250 ml Aether aus. Dieses wird auf eine 15 cm langen Kieselsäule gegeben, worauf man mit 500 ml Chloroform/
30 Methanol (9:1) eluiert, die Startzone aus der Säule nimmt und diese mit 1 Liter Methanol und dann mit 1 Liter Chloroform/Methanol/Wasser (2:7:1) extrahiert. Das aus den Extrakten erhaltene Material wird durch präparative Dick-schichtchromatographie weiter gereinigt; Laufmittel Chloro-
35 form/Methanol/Dimethylformamid/Wasser (1:2:1:1). Die Hauptzone wird nach dem Herauskratzen zweimal mit je 250 ml Methanol und zweimal mit je 250 ml Chloroform/Methanol/Wasser (2:7:1) extrahiert. Schliesslich wird das Produkt

noch viermal umgefällt. Hierzu löst man es zunächst in
möglichst wenig Methanol und fällt es dann durch lang-
sames Zutropfen von 250 ml Chloroform aus. Man erhält 30 mg
1-(5-Carboxypentyl)-4-(10,15,20-tri-4-pyridyl-21H,23H-
5 porphin-5-yl)pyridinium bromid.

c) Man löst 20 mg 1-(5-Carboxypentyl)-4-(10,15,20-tri-4-
pyridyl-21H,23H-porphin-5-yl)pyridinium bromid in 50 ml
Methanol/Wasser (9:1), gibt 3,5 g Methyljodid dazu und lässt
10 das Reaktionsgemisch bei Zimmertemperatur während 6 Tagen
im Dunkeln stehen. Dann wird das Lösungsmittel mit dem über-
schüssigen Methyljodid im Vakuum abgezogen und das Produkt
durch Umfällen gereinigt. Hierzu löst man es in möglichst
wenig Methanol (etwa 5 ml) und fällt es durch langsames
15 Zutropfen von 250 ml Chloroform wieder aus. Diese Reini-
gungsprozedur wird insgesamt dreimal durchgeführt. Man
erhält 7 mg 1-(5-Carboxypentyl)-1',1'',1'''-trimethyl-4,4',
4'',4'''-(21H,23H-porphin-5,10,15,20-tetrayl)tetrakispyridi-
nium bromid trijodid.

20

UV: λ (ϵ), 422 (224000), 519 (14300), 556 (6200), 584
(6800), 640 (2000) nm.

Beispiel 4

25

a) Man löst 15,2 ml Benzaldehyd und 7,51 g 4-Carboxy-
benzaldehyd in 746 ml siedender Propionsäure, versetzt
tropfenweise mit 13,9 ml Pyrrol, erhitzt anschliessend
das erhaltene Gemisch während etwa 30 Minuten unter Rück-
30 fluss und lässt dann auf Zimmertemperatur abkühlen. Das
Porphinderivat wird durch Zugabe von 0,5 l Wasser ausge-
fällt. Das abfiltrierte Rohprodukt wird durch zweimalige
Säulenchromatographie an 1,2 kg Kieselgel vorgereinigt,
wobei jeweils nacheinander mit den folgenden Lösungsmitteln
35 eluiert wird: Chloroform/Cyclohexan (1:1), Chloroform/Essig-
ester (3:2) und (1:1), Essigester sowie Essigester, das
2% Methanol enthält. Zur weiteren Reinigung schlämmt man das
Produkt in wenig Methanol auf und filtriert es ab. Dieser

Prozess wird so lange wiederholt bis das Filtrat nur noch schwach gefärbt ist. Dann wird das so erhaltene Produkt an einer Kieselgelsäule mit Chloroform, Chloroform/Essigester (1:1) und Essigester als Elutionsmittel chromatographiert. Man erhält 1,7 g 4-(10,15,20-Triphenyl-21H,23H-porphin-5-yl)benzoesäure als violette Kristalle.

b) In Analogie zu den Angaben in Beispiel 1 b) erhält man aus 200 mg 4-(10,15,20-Triphenyl-21H,23H-porphin-5-yl)benzoesäure 90 mg (33%) reines 4-[10,15,20-Tris(4-sulfo-phenyl)-21H,23H-porphin-5-yl]benzoesäure-tetranatriumsalz.

UV: λ (ϵ), 413 (418000), 517 (13600), 554 (6900), 578 (5900), 634 (3200) nm.

15

Beispiel 5

a) Man löst 430 mg Tetrapyridylporphin in 150 ml Chloroform/Methanol (9:1), versetzt mit 1,05 g 3-Brom-propionsäure und erhitzt das Gemisch unter Rühren 18 Stunden lang auf 60°C. Dann engt man die Lösung im Vakuum auf etwa 10 ml ein und fällen das Produkt durch langsame Zugabe von 300 ml Aether aus. Das abfiltrierte Porphingemisch wird auf eine Kieselgelsäule (Länge 15 cm, Durchmesser 2 cm) gegeben, worauf man mit 500 ml Chloroform/Methanol (9:1) eluiert. Dabei bleibt das gewünschte Produkt als violette Zone am Start zurück. Diese Startzone wird aus der Säule genommen und mit 2 l Methanol, sowie mit 2 l Chloroform/Methanol/Dimethylformamid/Wasser (1:2:1:1) extrahiert. Die weitere Reinigung des Produktes erfolgt mittels präparativer Dickschichtchromatographie [Laufmittel: Chloroform/Methanol/Dimethylformamid/Wasser (1:2:1:1)]. Die Hauptzone wird nach dem Herauskratzen viermal mit je 250 ml Chloroform/Methanol/Wasser (2:7:1) extrahiert. Schliesslich wird das Produkt noch viermal umgefällt, indem man es in möglichst wenig (\sim 40 ml) Chloroform/Methanol/Wasser (2:7:1) löst und dann durch langsames Zutropfen von 300 ml Chloroform wieder ausfällt. Man erhält 42 mg reines 1-(2-Carboxy-

äthyl)-4-(10,15,20-tri-4-pyridyl-21H,23H-porphin-5-yl)-pyridinium bromid als violette Kristalle.

b) Man löst 40 mg 1-(2-Carboxyäthyl)-4-(10,15,20-tri-4-pyridyl-21H,23H-porphin-5-yl)-pyridinium bromid in 120 ml Chloroform/Methanol/Wasser (2:7:1), gibt 7,1 g Methyljodid dazu und lässt das Reaktionsgemisch bei Zimmertemperatur während 6 Tagen im Dunkeln stehen. Dann wird das Volumen der Lösung im Vakuum auf 20 ml eingeeengt, und das Produkt durch langsame Zugabe von 20 ml Aether ausgefällt. Nach dem Abfiltrieren und Auswaschen des Produktes mit Aether wird dieses durch dreimaliges Umfällen gereinigt. Hierzu löst man es jeweils in 20 ml Methanol und fällt es durch langsames Zutropfen von 200 ml Aether wieder aus. Man erhält 18,5 mg reines 1-(2-Carboxyäthyl)-1',1'',1'''-trimethyl-4,4',4'',4'''-(21H,23H-porphin-5,10,15,20-tetrayl)tetrakispyridinium bromid trijodid als violettes Pulver.

UV: λ (ϵ), 422 (236000), 519 (14600), 554 (5700), 584 (6200), 640 (1400) nm.

Beispiel 6

a) Man löst 619 mg Tetrapyridylporphin und 2,79 g Jodessigsäure in 300 ml Chloroform/Methanol (9:1) auf und lässt dieses Gemisch 22 Stunden bei Zimmertemperatur im Dunkeln stehen. Dann wird die Lösung im Vakuum auf etwa 20 ml eingeeengt, und das Produkt durch langsames Zutropfen von 400 ml Aether ausgefällt. Das abfiltrierte und gut mit Aether ausgewaschene Porphingemisch wird auf eine Kieselgelsäule (Länge 15 cm, Durchmesser 2 cm) gegeben, worauf man mit 500 ml Chloroform/Methanol (9:1) eluiert. Das gewünschte Produkt bleibt dabei als violette Startzone zurück. Diese wird aus der Säule genommen und mit Chloroform/Methanol/Wasser (1:3,5:0,5) extrahiert. Die weitere Reinigung erfolgt mittels präparativer Dickschichtchromatographie (vgl. Beispiel 5), sowie durch Chromatographie an einer Kieselgelsäule [Länge 20 cm, Durchmesser 1 cm, Laufmittel:

Chloroform/Methanol/Wasser (2:7:1)]. Schliesslich wird das Produkt noch insgesamt dreimal umgefällt, indem man es in etwa 30 ml Chloroform/Methanol/Wasser (2:7:1) löst und dann durch langsames Zutropfen von 300 ml Aether wieder ausfällt.

5 Man erhält 68 mg 1-(Carboxymethyl)-4-(10,15,20-tri-4-pyridyl-21H,23H-porphin-5-yl)pyridinium jodid als violette Pulver.

b) Man löst 68 mg 1-(Carboxymethyl)-4-(10,15,20-tri-4-pyridyl-21H,23H-porphin-5-yl)pyridinium jodid in 350 ml Chloroform/Methanol/Wasser (2:7:1), gibt 14 g Methyljodid dazu und lässt das Reaktionsgemisch bei Zimmertemperatur während 6 Tagen im Dunkeln stehen. Dann wird im Vakuum auf etwa 40 ml eingeengt, mit 40 ml Methanol versetzt,
15 und das Produkt durch langsame Zugabe von 350 ml Aether ausgefällt. Nach dem Abfiltrieren und Auswaschen des Produktes mit Aether wird dieses durch dreimaliges Umfällen gereinigt. Hierzu löst man das Produkt jeweils in 40 ml Methanol und fällt es durch langsames Zutropfen von 300 ml
20 Aether wieder aus. Man erhält 36 mg 1-(Carboxymethyl)-1',1'',1'''-trimethyl-4,4',4'',4'''-(21H,23H-porphin-5,10,15,20-tetrayl)tetrakispyridinium tetrajodid.

UV: λ (ϵ), 422 (210000), 519 (14100), 554 (6000), 584
25 (6200), 640 (1600) nm.

Beispiel 7

Markierung von anti-CEA mit 6-[4-[10,15,20-Tris(4-sulfo-
30 phenyl)-21H,23H-porphin-5-yl]phenyl]hexancarbonsäure tetranatriumsalz.

Die Kopplung des obenerwähnten Porphinderivates an anti-CEA erfolgte wie unten beschrieben mit Hilfe des wasser-
35 löslichen Carbodiimid-Derivates 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholin-äthyl)-carbodiimid-methyl-p-toluol-sulfonat.

Für die Kopplungsreaktion stellt man die folgenden

Stammlösungen her:

1. 4 mg/ml Porphinderivat in Wasser bei pH 4,5; oliv-grüne Lösung.

5

2. 2,9 mg/ml anti-CEA vom Kaninchen (DAKO Code No. A 115, Lot 042 A) in 200 mM NaHCO₃; pH 8.6.

Zu 3,2 mg 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoäthyl)-carbo-
10 diimid-methyl-p-toluolsulfonat gibt man 400 µl der Stamm-
lösung 1 mit dem Porphinderivat und durchmischt kurz am
Vortex. Nach 2 Minuten fügt man 400 µl der anti-CEA-Stamm-
lösung 2 hinzu und durchmischt kurz am Vortex. Die Lösung
verfärbt sich dabei rot und weist einen pH von 8,2 auf.
15 Dieser wird mit wenig 1 N NaOH auf 8,6 eingestellt. Dann
lässt man das Reaktionsgemisch im Dunkeln 16 Stunden bei
Zimmertemperatur stehen.

Zur Abtrennung des markierten anti-CEA's wurden 500 µl
20 des Reaktionsgemisches über eine Säule (Länge 30 cm, Durch-
messer 9 mm) mit Acrylamid Gel (AcA-54 von LKB) chromato-
graphiert (Eluiermittel: 150 mM Natriumchlorid, 10 mM
Natriumphosphat, 0,02% Natriumazid, pH 7,0). Die Fraktionen
mit dem höchsten Gehalt an markiertem anti-CEA wurden ge-
25 poolt - insgesamt 5 ml. In dieser Lösung wurde UV-spektros-
kopisch der Gehalt an anti-CEA (bei 278 nm) und an Por-
phyrinderivat (bei 417 nm) bestimmt. Es wurden dabei fol-
gende Konzentrationen erhalten:

30 $0,31 \times 10^{-6}$ M/l Porphinderivat
und $0,73 \times 10^{-6}$ M/l anti-CEA.

Dies entspricht einem Markierungsgrad von 0,42.

Beispiel 8

35

Durchführung eines Fluoreszenzimmunoassays

Quantitative Bestimmung von CEA-Standards mit einem

monoklonalen CEA-Antikörper und einem gebräuchlichen CEA-Antikörper (Kaninchen):

5 In die erforderliche Anzahl Teströhrchen (10 x 75 mm) werden je 0,250 ml CEA-Standardlösung (0 ng/ml CEA; 2,0 ng/ml CEA; 5 ng/ml CEA; 10 ng/ml CEA und 20 ng/ml CEA in 0,2 M/l Natriumacetat, pH 5 mit 4 g/l Rinderserumalbumin) pipettiert, je eine mit monoklonalem Maus anti-CEA sensibilisierte Polystyrolkugel (Durchmesser 6,5 mm) zugefügt
10 und bei 37°C während 24 Stunden inkubiert.

Anschliessend werden die Polystyrolkugeln dreimal mit je 2 bis 5 ml dest. Wasser gewaschen und dann in Teströhrchen transferiert, die je 0,250 ml Pufferlösung mit
15 2×10^{-8} M/l Kaninchen anti-CEA enthalten, das mit Porphyrinderivat markiert ist (Markierungsgrad 0,42). Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37°C werden die Kugeln wieder dreimal mit je 2 bis 5 ml dest. Wasser gewaschen und anschliessend in Teströhrchen mit je 2 ml Schwefelsäure
20 (0,09 N) transferiert. Nach 30 Minuten pipettiert man die Schwefelsäure-Lösung in Messküvetten und misst den Gehalt an Porphinderivat (bzw. anti-CEA) fluoreszenz-spektroskopisch (Anregungswellenlänge 433 nm; Emissionswellenlänge 670 nm).

25

In Tabelle I sind die Werte einer CEA-Bestimmung aufgeführt, die mit einer Reihe von CEA-Standards von ROCHE erhalten wurden.

30

35

Tabelle I: Fluoreszenzspektroskopische Bestimmung von CEA-Standards

5	Konzentration an CEA (ROCHE Standard Lösungen)	Rel. Fluoreszenzintensität
	0 ng/ml CEA	0,275
	2 ng/ml CEA	0,750
10	5 ng/ml CEA	1,325
	10 ng/ml CEA	2,400
	20 ng/ml CEA	3,400

15 In Figur I wird die relative Fluoreszenzintensität gegen die Konzentrationen an CEA in ng/ml aufgetragen.

Beispiel 9

20 Mit dem gleichen Vorgehen wie in Beispiel 8 wurde eine normale humane Serumprobe analysiert, wobei ein CEA Gehalt von 1 ng/ml gefunden wurde.

25

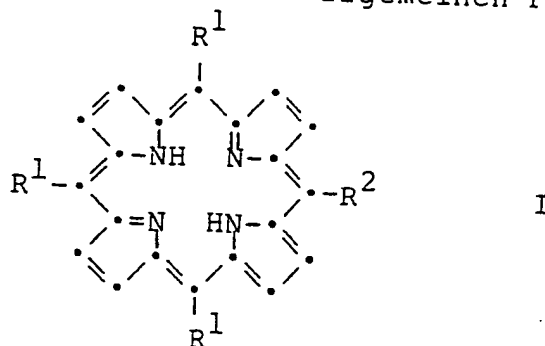
30

35

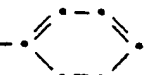
Patentansprüche

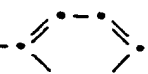
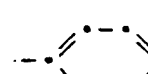
1. Porphyrinderivate der allgemeinen Formel

5

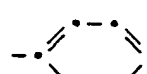
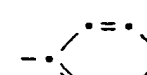


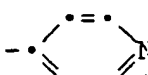
10

worin entweder R¹ die Gruppe -SO₃H und R²

die Gruppe , -A-COOH oder

15

, oder R¹ die Gruppe -N-R³X⁺

und R² die Gruppe -N-A-COOHX⁻ bedeuten, wobei

20

X⁻ ein Halogenion, ein Arylsulfonation, ein Alkylsulfonation oder ein Alkylsulfation, A (C₁-₈)-Alkylen und R³ (C₁-₄)-Alkyl bedeuten,

und Sulfonsäuresalze von Verbindungen der Formel I, worin

R¹ die Gruppe -SO₃H bedeutet.

25

2. 4-[10,15,20-Tris(4-sulfophenyl)-21H,23H-porphin-5-yl]benzoesäure.

3. [4-[10,15,20-Tris(4-sulfophenyl)-21H,23H-porphin-5-yl]phenoxy]essigsäure.

30

4. 6-[4-[10,15,20-Tris(4-sulfophenyl)-21H,23H-porphin-5-yl]phenyl]hexancarbonsäure.

35

5. 1-(Carboxymethyl)-1',1'',1'''-trimethyl-4,4',4'',4'''-(21H,23H-porphin-5,10,15,20-tetrayl)tetrakispyridinium tetra-jodid.

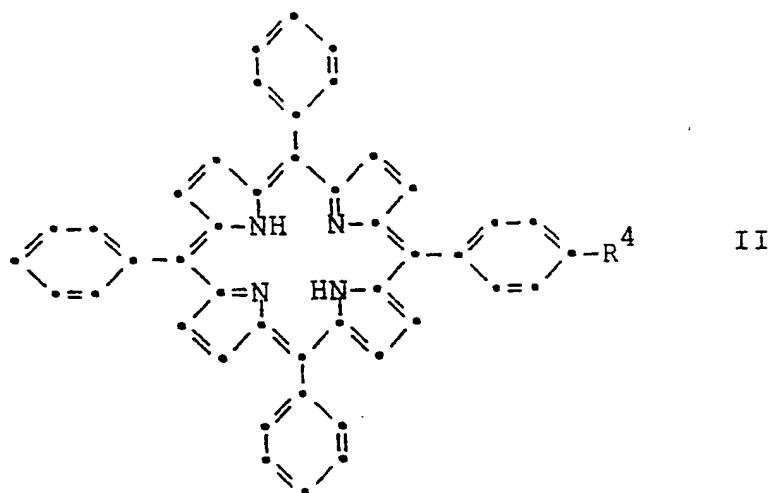
6. 1-(2-Carboxyäthyl)-1',1'',1'''-trimethyl-4,4',4'',4'''-(21H,23H-porphin-5,10,15,20-tetrayl)tetrakispyridinium bromid trijodid.

5 7. 1-(5-Carboxypentyl)-1',1'',1'''-trimethyl-4,4',4'',4'''-(21H,23H-porphin-5,10,15,20-tetrayl)tetrakispyridinium bromid trijodid.

8. Verbindungen der allgemeinen Formel

10

15



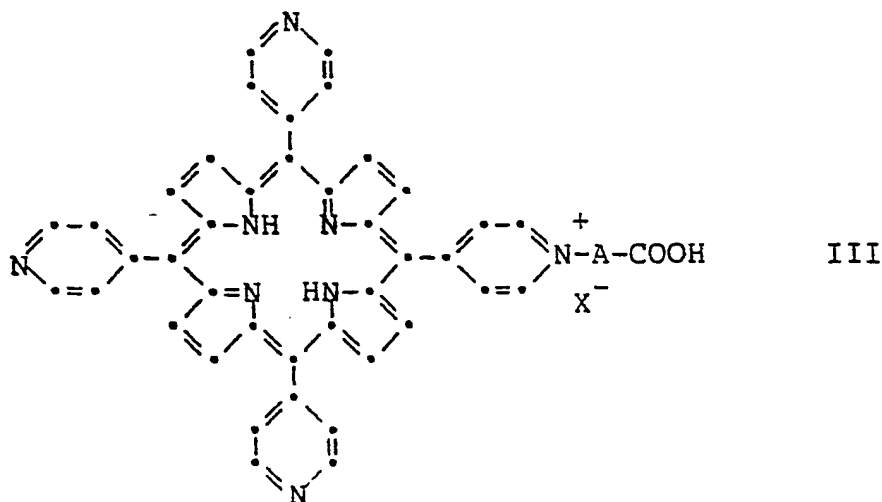
20

worin R^4 die Gruppe $-\text{COOH}$, $-\text{A}-\text{COOH}$ oder $-\text{O}-\text{A}-\text{COOH}$ und A (C_{1-8}) -Alkylen bedeuten.

9. Verbindungen der allgemeinen Formel

25

30



35

worin X^- ein Halogenion, ein Arylsulfonation, ein Alkylsulfonation oder ein Alkylsulfation und A

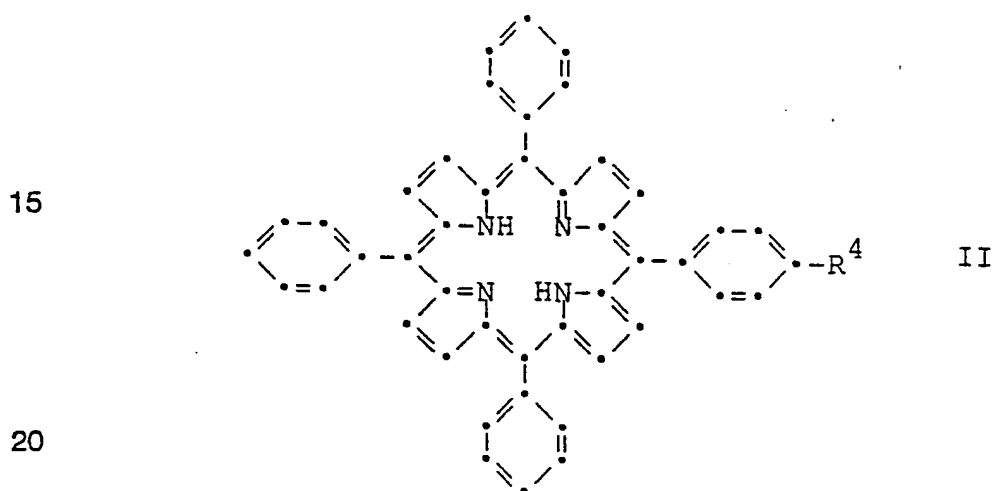
(C₁₋₈)-Alkylen bedeuten.

10. Verbindungen der allgemeinen Formel I als Marker in Fluoreszenz-Immuno-Assays.

5

11. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen gemäss einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass man

10 a) eine Verbindung der allgemeinen Formel

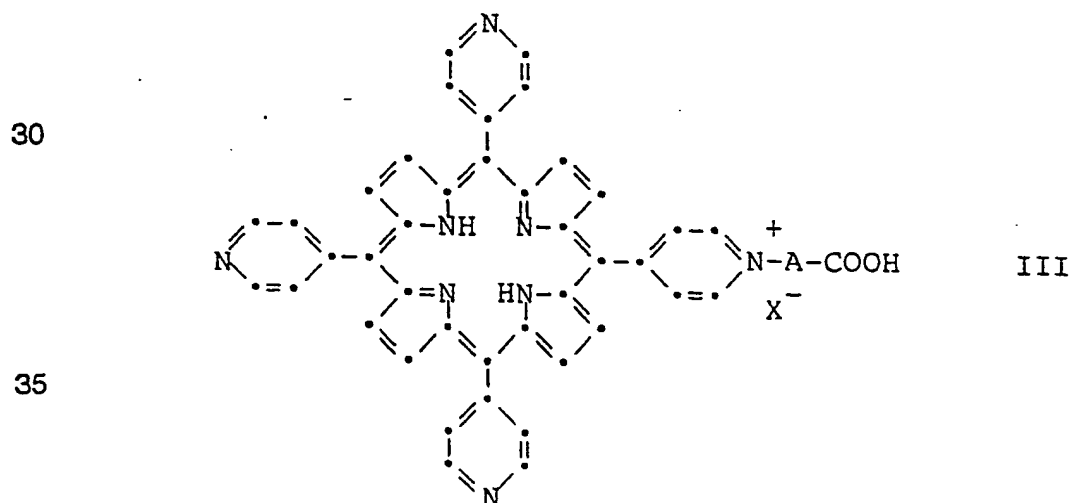


worin R⁴ die Gruppe -COOH, -A-COOH oder -O-A-COOH und A (C₁₋₈)-Alkylen bedeuten,

mit einem die Gruppe -SO₃H liefernden Mittel umgesetzt, oder

25

b) eine Verbindung der allgemeinen Formel



worin A (C₁₋₈)-Alkylen und X⁻ ein Halogenion, ein Arylsulfonation, ein Alkylsulfonation oder ein Alkylsulfation bedeuten,

mit einem einen (C₁₋₄)-Alkylrest liefernden Mittel be-
5 handelt und erwünschtenfalls

c) eine nach Verfahren a) erhaltene Verbindung in ein Sulfonsäuresalz überführt.

10 12. Verwendung der Verbindungen der allgemeinen Formel I als Marker in Fluoreszenz-Immuno-Assays.

13. Verwendung der Verbindungen der allgemeinen Formel I als Marker in Fluoreszenz-Immuno-Assays mit zeit-
15 aufgelöster Fluoreszenzmessung.

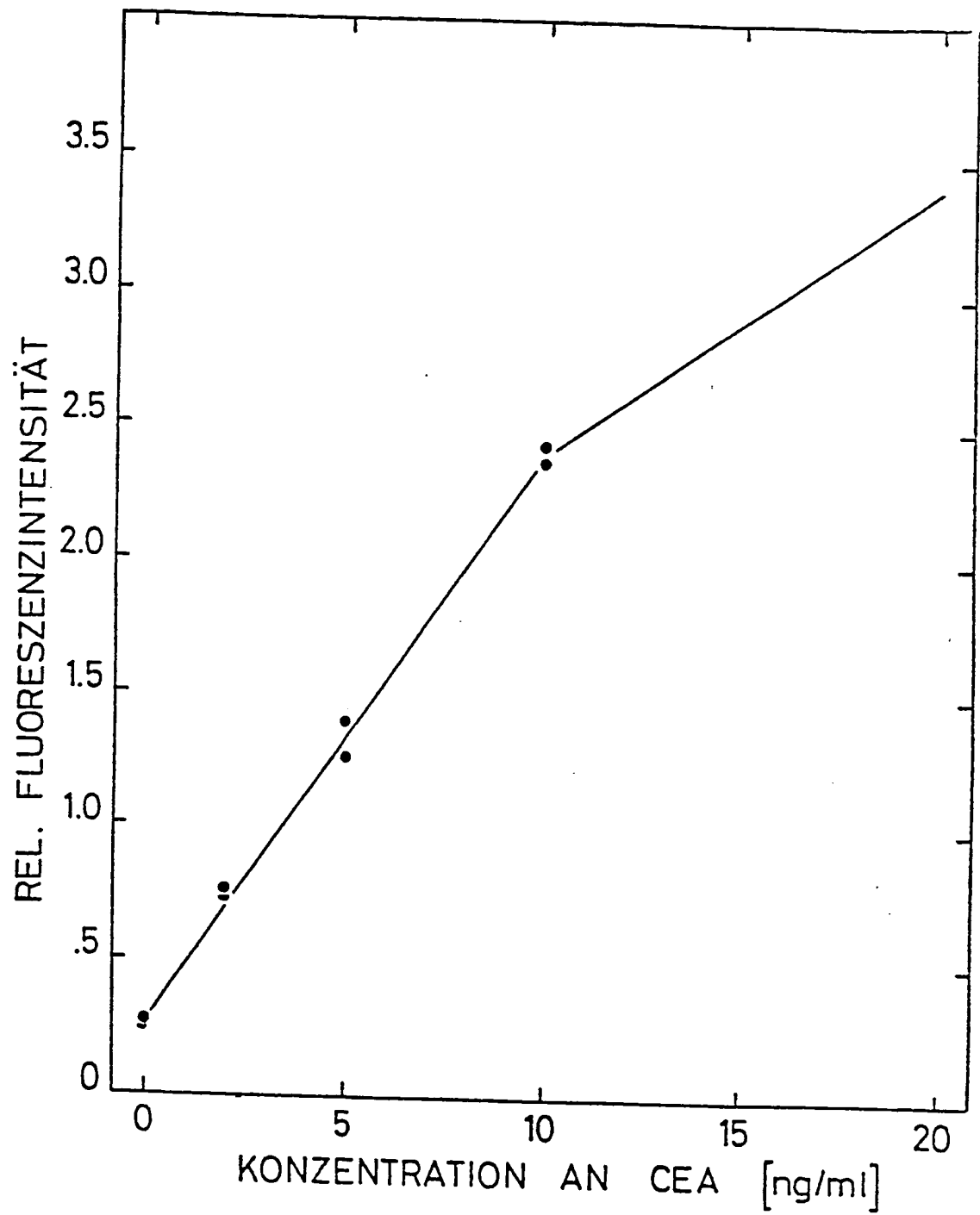
14. Verwendung der Verbindungen gemäss allgemeiner Formel I nach Patentanspruch 12 oder 13 zur Bestimmung von CEA.

20

25

30

35

Figur I



EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			EP 84105272.3
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 7)
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, unexamined applications, C Sektion, Vol. 3, No. 118, 4. Oktober 1979, THE PATENT OFFICE JAPANESE GOVERNMENT, Seite 141 C 60 * Kokai-No. 54-100 398 (KYOWA HAKKO KOGYO K.K.) * --	1,2,14	C 07 D 487/22 C 09 B 47/00 G 01 N 33/54
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, unexamined applications, C Field, Vol. 4, No. 140, 3. Oktober 1980, THE PATENT OFFICE JAPANESE GOVERNMENT, Seite 3 C 26 * Kokai-No. 55-87 793 (MIDORI JUJI K.K.) * --	1	
P,A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, unexamined applications, C Field, Vol. 7, No. 277, 9. Dezember 1983, THE PATENT OFFICE JAPANESE GOVERNMENT, Seite 8 C 199 * Kokai-No. 58-154 581 (MITSUBISHI KASEI KOGYO K.K.) * --	1	
A	CH - A5 - 596 211 (BASF AKTIENGESELLSCHAFT) * Patentanspruch *	1	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort WIEN		Abschlußdatum der Recherche 23-08-1984	Prüfer PETROUSEK
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrundeliegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			



EP 84105272.3

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der Maßgeblichen Teile	betrifft Anspruch	
A	EP - A2 - 0 071 991 (BIO-DIAGNOSTICS, INC.) * Ansprüche 2,6,7 * -----	1,10, 12,13	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.)